

水溶性冰片磷酸酯前药的设计、合成及生物活性评价

张璐璐¹, 孙美玲², 秦亚娟¹, 厉廷有^{1*}

(¹ 南京医科大学药学院, 南京 211166; ² 南京医科大学基础医学院, 南京 211166)

摘要 对冰片进行结构优化, 以改善冰片的溶解性, 促进其在脑卒中治疗方面的进一步应用。利用磷酸酯修饰原理, 设计并合成冰片前药 **BP-3**。使用蒸发光散射检测器 (ELSD) 测定 **BP-3** 的溶解性, 在小鼠血浆中测试原药释放的程度与速度, 并在短暂性大脑中动脉闭塞 (tMCAO) 小鼠模型中评估 **BP-3** 的神经保护作用。结果显示, **BP-3** 在 20 mg/mL 时可以完全溶解于生理盐水; 在小鼠血浆中, 2 h 内释放约 40% 的冰片; 在 tMCAO 小鼠模型中, TTC 染色结果显示 **BP-3** 可以有效减少梗死面积; 尼氏染色结果表明, **BP-3** 可以改善神经元损伤; 握力和抓力测试结果阐明, **BP-3** 可以减少损伤带来的运动能力降低; 转棒测试结果证明, **BP-3** 可以促进小鼠运动能力的恢复。 **BP-3** 具有良好的水溶性、适宜的原药释放速率以及优异的神经保护作用, 具备广阔的药物开发前景。

关键词 冰片; 磷酸酯; 缺血性脑卒中; 水溶性改善

中图分类号 R914.4; R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)03-0375-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023060703

引用本文 张璐璐, 孙美玲, 秦亚娟, 等. 水溶性冰片磷酸酯前药的设计、合成及生物活性评价 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(3): 375–380.

Cite this article as: ZHANG Lulu, SUN Meiling, QIN Yajuan, *et al.* Design, synthesis and biological activity evaluation of water-soluble borneol phosphate prodrug[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(3): 375–380.

Design, synthesis and biological activity evaluation of water-soluble borneol phosphate prodrug

ZHANG Lulu¹, SUN Meiling², QIN Yajuan¹, LI Tingyou^{1*}

¹School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

Abstract In this study, structural optimization of borneol was carried out to improve their solubility and promote their further application in stroke therapy. **BP-3**, a prodrug of borneol, was designed and synthesized based on the principle of phosphate modification. The solubility of **BP-3** was determined by evaporative light scattering detector (ELSD), and the degree and speed of drug release were tested in mouse plasma, and the neuroprotective effect of **BP-3** was evaluated in mouse model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). According to the results, **BP-3** was completely soluble in saline at 20 mg/mL; in mouse plasma, approximately 40% of the borneol were released within 2 h; in the tMCAO mouse model, TTC staining showed that **BP-3** was effective in reducing the infarct area; Nissl staining showed that **BP-3** ameliorated the neuronal injury; the grip and grasping strength tests elucidated that **BP-3** reduced the damage of sports ability caused by injury; and the rotating rod test proved that **BP-3** could promote the recovery of motor ability in mice. **BP-3** has good water solubility, suitable drug release rate and excellent neuroprotective effects, and has broad prospects for drug development.

Key words borneol; phosphate; ischemic stroke; improved water solubility

收稿日期 2023-06-07 * 通信作者 Tel: 025-86868474 E-mail: l_tingyou@njmu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No.81573280; No.81803349)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81573280; No.81803349)

脑卒中, 又称中风, 是我国国民的第一位致死原因。我国每年新发脑卒中患者约 460 万人, 并以每年 8.7% 的速度上升, 其中 70% 以上患者是缺血性脑卒中^[1], 给家庭和社会带来沉重的经济负担。因此, 除了对脑卒中的危险因素进行积极的干预之外, 脑卒中治疗药物的研发也是刻不容缓。2020 年先声药业有限公司自主研发的用于治疗急性缺血性卒中的“先必新”依达拉奉右莰醇注射用浓溶液获批上市, 此注射液的规格是依达拉奉-右坎醇(右旋冰片)(4:1), 该药物的成功上市肯定了冰片对卒中治疗的治疗价值^[2]。2020 年版的《中华人民共和国药典》收录了 3 种冰片产品: D-冰片、L-冰片和合成冰片。冰片不仅能够促进药物入脑, 还能干预降低大脑中的炎症反应。截至目前, 已有多篇文献报道冰片具有改善和抵抗缺血性卒中急性期脑部活性氧损伤的能力^[2-4]。

冰片是一种双环单萜类化合物, 在乙醇、氯仿和乙醚中极易溶解, 而在水中几乎不溶, 其高度脂溶性限制了它在临床上的进一步开发和利用。鉴于冰片在缺血性卒中的潜在价值, 本研究对冰片进行结构改造, 以期提高冰片的水溶性, 调节冰片的理化性质, 提高冰片的成药性。

通过前药修饰提高化合物水溶性是常见的先导物结构优化策略, 而磷酸酯类前药是常用的前药设计方法之一。由于磷酸具有很强的极性, 以及在机体内含有多磷酸酯酶, 因此, 通过在水溶性差的化合物中引入磷酸基团, 可以大大改善化合物的水溶性, 并且在磷酸酯酶的作用下, 磷酸酯前药又能水解为原药发挥药效^[5]。利用磷酸酯前药原理开发的上市药物, 如福沙那韦是安瑞那韦的磷酸酯前药, 磷丙泊酚二钠是镇静药丙泊酚的磷酸酯前药, 磷苯妥英钠是苯妥英的磷酸酯前药。磷苯妥英钠的水溶性是苯妥英钠的 4000 倍, 水溶液 pH 8.6~12, 从而克服了苯妥英钠临床使用带来的不良反应, 因而成为疗效好、安全性高、刺激性小的抗癫痫新药。基于这样的化合物结构优化策略和实验

基础, 本研究设计并合成了化合物 **BP-3** (图 1), 并表征了其水溶性及神经保护作用。

1 材料

1.1 仪器

400MHz 核磁共振谱仪 (日本电子株式会社); LC/MS 质谱仪 (美国安捷伦公司); TLC 硅胶板 (青岛化工研究所); FLUOstar Omega 全自动多功能酶标仪 (德国 BMG LabTech 公司); Delta 600 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司,); 5C₁₈-AR-II 色谱柱 (日本 Cosmosil 公司); 蒸发光散射检测器、DGU-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); W800 数码相机 (日本索尼株式会社)。

1.2 试剂

2-右坎醇 (江西雪松天然药用油有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 动物

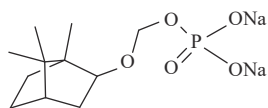
SPF 级 C57BL/6J 小鼠若干, 雄性, 体重 (21 ± 2) g, 6~8 周龄; ICR 小鼠, 雌性, 体重 20~30 g, 8 周龄。所有小鼠均购自南京医科大学动物中心, 许可证号: SEXK (苏) 2021-0001。动物实验遵循南京医科大学伦理委员会批准的《实验动物管理办法》等相关规定。小鼠每日光照 12 h, 温度 (24 ± 2) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 给予标准饲料及饮用水, 以充分适应环境。本研究所有动物实验操作经由南京医科大学实验动物福利伦理审查委员会许可 (IACUC-1812012)。

2 方法

2.1 化学合成

BP-3 的合成路线如图 2 所示。

2.1.1 冰片基氯甲醚 (**BP-1**) 的合成 称取天然冰片 30.8 g (199.7 mmol)、三聚甲醛 10.2 g (113.2 mmol) 于 250 mL 三颈瓶中, 加入乙醚 50 mL, 在室温下搅拌至固体溶解。浓硫酸缓慢滴加入氯化钠固体中反应产生氯化氢气体, 产生的氯化氢气体通入反应液中, 持续通入氯化氢气体, 直至饱和, 约需 6 h, 饱和后再缓慢通氯化氢气体 2 h, 通气结束后, 室温下持续搅拌 12 h。反应结束后, 加石油醚 50 mL, 用加冰的食盐水洗涤 2 次。有机层用无水硫酸



BP-3

Figure 1 Chemical structure of BP-3

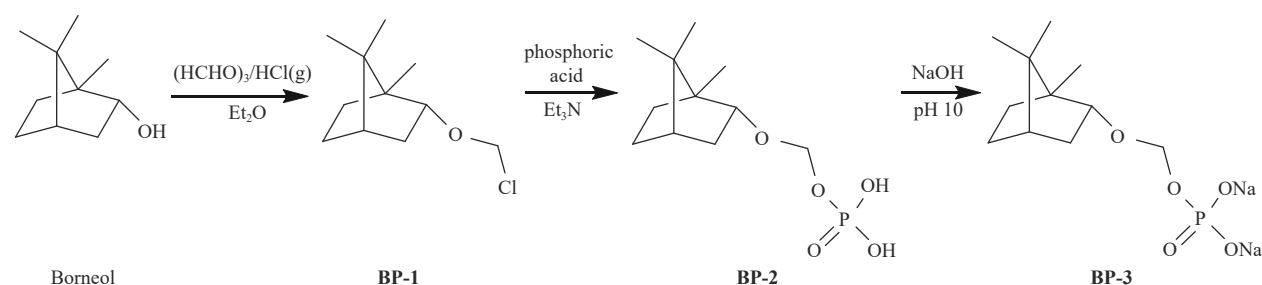


Figure 2 Synthetic route of compound BP-3

钠干燥, 过滤, 减压除去溶剂。残余物减压蒸馏, 0.2 kPa 下收集 68~70 °C 馏分, 得无色透明液体 **BP-1** 27.5 g, 收率 68%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.57~5.40 (2H, m, -O-CH₂-Cl), 4.01~3.96 (1H, m, 2-CH), 2.28~2.19 (1H, m, 3-CH), 1.92~1.83 (1H, m, 5-CH), 1.77~1.66 (2H, m, 4-CH, 6-CH), 1.29~1.18 (2H, m, 5-CH, 6-CH), 1.13~1.08 (1H, dd, *J*=4.46, 13.31 Hz, 3-CH), 0.89~0.83 (9H, m, 1-CH₃, 7-(CH₃)₂)。 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 85.49, 83.38, 49.06, 47.84, 45.02, 35.94, 28.14, 26.69, 19.70, 18.92, 13.51。 ESI-MS *m/z*: 203.88[M + H]⁺。

2.1.2 冰片基磷酸酯 (BP-3) 的合成 将 85% 磷酸 10.2 g (88.5 mmol) 溶于 100 mL 乙腈中, 加入三乙胺 24.9 mL (179.1 mmol), 升温到 60 °C 搅拌 30 min。加入 **BP-1** 3.6 g (17.8 mmol) 溶于 10 mL 乙腈的溶液。60 °C 下继续搅拌 2 h。反应结束后减压浓缩, 加入水 20 mL, 用 10% 盐酸溶液调节溶液 pH 至 1, 用乙醚萃取 (3 × 30 mL), 合并萃取液, 加入水 20 mL, 用 10% NaOH 调节溶液 pH 至 10, 振荡后分液, 水层再用乙醚萃取 (3 × 30 mL)。水层冻干, 得白色固体 **BP-3** 1.5 g, 产率 27.3%。¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ: 5.07~4.87 (2H, m, -O-CH₂-O-), 4.13~3.97 (1H, m, 2-CH), 2.35~2.18 (1H, m, 3-CH), 1.81~1.59 (3H, m, 4-CH, 5-CH, 6-CH), 1.37~1.12 (2H, m, 5-CH, 6-CH), 1.11~0.98 (1H, m, 3-CH), 0.90~0.81 (9H, m, 1-CH₃, 7-(CH₃)₂)。 ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ: 90.04, 84.80, 48.50, 47.41, 44.53, 36.11, 27.70, 26.42, 19.13, 18.21, 13.13。 ³¹P NMR (163 MHz, D₂O) δ: 1.96。 ESI-MS *m/z*: 263.25[M - 2Na + 1]⁻。

2.2 BP-3 的溶解度检测实验

用 0.9% 生理盐水溶液配制 20, 15, 10, 5, 2.5 mg/mL 的 **BP-3** 溶液。溶液用滤膜过滤, 使用 ELSD 检测器检测峰高, 设置为等度洗脱, 流动相为甲醇

0.8 mL/min 和水 20 mL/min。检测器设置为响应: 1.0 s; 极性 (P): +; 池温度: 40 °C; 灯 (L): D2; 波长通道: 254 nm。进样量: 10 μL。使用 GraphPad Prism 7 制作样品的水溶性曲线。

2.3 BP-3 在小鼠血浆中的生物转化实验

2.3.1 溶液的配制

冰片贮备液的配制: 精确称取冰片 1.0 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容, 配制成 0.1 mg/mL 的标准溶液, 4 °C 保存。

内标 (氟西汀) 的配制: 称取氟西汀 10 mg 于 10 mL 量瓶, 用甲醇溶解定容, 配制成 10 mg/mL 的标准溶液。取 0.1 mL 于 10 mL 量瓶, 用甲醇定容, 配制成 10 μg/mL 的标准溶液作为血浆中化合物检测内标。

2.3.2 血浆的制取 取未用药健康 ICR 小鼠全血 (20~30 g, 雌性)。血液样本在取样后立即与肝素钠涡旋混合。全血在 4 °C, 5500 r/min 条件下离心 5 min, 吸取血浆, 分装保存在 -80 °C 冰箱。

2.3.3 标准曲线的绘制 将小鼠空白血浆在 37 °C 下预热 15 min, 之后用血浆将冰片储备液配制成质量浓度为 0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、15、20、30 μg/mL 的标准空白血浆系列样本。取孵育血浆 (50 μL), 用乙腈 (150 μL) 猝灭代谢反应, 加入氟西汀 (5 μL) 作为内标。每组浓度设 3 组平行, 于室温下 13300 r/min 离心 15 min 后, 取上清液过滤后进行液质分析。

记录血浆样品中冰片和氟西汀内标的色谱峰面积, 以冰片浓度为横坐标 (*X*), 冰片峰面积与内标峰面积比值为纵坐标 (*Y*), 使用加权 (*W* = 1/*X*²) 最小二乘法进行线性回归运算, 求得直线回归方程。

2.3.4 实验步骤 将 **BP-3** 溶于水 (5 mg/mL), 在预热 15 min 的 37 °C 血浆 (445 μL) 中加入 **BP-3** 溶液 (5 μL), 使 **BP-3** 的终浓度为 50 μg/mL。在孵育 1、5、10、15、30、45、60 和 120 min (8 组) 后, 取孵育

血浆 (50 μL), 用乙腈 (150 μL) 猝灭代谢反应, 加入氟西汀 (5 μL) 作为内标。所有样品设 3 组平行, 于室温下 13 300 r/min 离心 15 min 后, 取上清液过滤后进行液质分析。

2.4 短暂性大脑中动脉闭塞模型 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 造模

取雄性 C57BL 小鼠, 饲养 7 d 后随机分为 3 组: 假手术组、模型组、BP-3 组。造模前 3 天, 每天灌胃 BP-3 (10 mg/kg)。第 4 天麻醉小鼠, 分离颈总动脉、颈外及颈内动脉, 结扎颈外和颈总近心端, 从颈外插入线栓直到大脑前动脉起始端, 并持续 1 h, 拔出恢复血流后缝合伤口并用碘伏擦拭。

2.5 BP-3 改善 tMCAO 模型小鼠的运动功能

2.5.1 抓力测试 前肢抓力测试用来测试和评价前肢神经肌肉功能, 小鼠脑卒中后, 大脑运动皮层神经元受到损伤, 导致其抓力异常, 通过测试抓力变化, 可以反映脑卒中恢复情况。脑缺血 4 d 后, 使用抓力测定系统测定小鼠抓力, 当小鼠前肢抓住网格上的抓杆后, 轻轻向后牵拉鼠尾, 在小鼠前肢松开的瞬间抓力达到最大值, 生物机能信号系统软件记录数据, 每只小鼠被重复测试 3 次, 取均值做统计分析。

2.5.2 握力测试 为了分析协调和运动功能, 小鼠脑缺血 3 d 后进行了握力测试。将动物放在两个支撑物之间的绳子中间, 绳子长 50 cm, 评分如下。0: 脱落; 1: 用一只或两只前爪抓住绳子; 2: 类似 1, 并试图爬上绳子; 3: 用一只或两只前爪加一只或两只后爪挂在绳子上; 4: 用前后爪加尾巴缠绳子挂在绳子上; 5: 逃到支撑平台。

2.5.3 转棒运动功能测试 转棒疲劳测试通常用来评价动物运动的协调平衡能力。在行为测试期间, 为了挑选在同样条件下能够适应疲劳转棒运动的小鼠, 所有小鼠于术前在疲劳转棒上进行 2 d 的预训练。将动物放在静止的转棒上 2 min, 转速从 5~40 r/min, 每次 5 min, 每天训练 2 次。小鼠在训练过程中掉落, 放回转棒继续训练直到结束。造模术前, 所有接受训练的动物进行疲劳转棒测试, 记录第 1 次从转棒上掉落的时间, 每只动物重复测试 3 次, 取平均值, 实验选取可以在转棒上停留 300 s 左右的小鼠进行 tMCAO 脑卒中模型手术造模。术后连续 4 d 于同一时间进行转棒运动功能测试, 将小鼠放在转棒上, 调整转速从 5 r/min 到 40 r/min, 记录小鼠从转棒上第 1 次掉落的时间, 重复两次,

记录小鼠停留时间, 分析数据。

2.6 尼氏 (Nissl) 染色

尼氏染色法可以染出尼氏体。在神经细胞受到损伤时, 尼氏小体的数量会减少甚至消失, 可以通过对尼氏体的观察来了解神经元的损伤情况。末次行为学之后, 小鼠灌注固定, 取脑冰冻切片后进行尼氏染色。

2.7 统计分析

所有实验数据使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析, 实验结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 采用 One Way ANOVA 进行组间分析。 $P < 0.05$ 代表具有显著性差异。

3 结 果

3.1 BP-3 的溶解度检测

质量浓度 0.25~20 mg/mL 范围内的 BP-3 生理盐水溶液与高效液相 ELSD 检测器检测到的峰面积呈线性拟合, 方程式为 $Y = 1022846X - 1145389$ ($R^2 = 0.996$), 表明 20 mg/mL 的 BP-3 能完全溶解在生理盐水溶液中, 磷酸酯结构极大地提高了冰片的水溶性。

3.2 BP-3 在小鼠血浆中的生物转化实验

3.2.1 标准曲线的绘制 在 0~30 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内, 小鼠血浆中冰片的浓度和冰片的峰面积与内标峰面积比值有良好的线性关系, 方程式为 $Y = 0.06572X + 0.001513$ ($R^2 = 0.998$)。

3.2.2 BP-3 在小鼠血浆中的原药释放 在小鼠血浆中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后, BP-3 可以缓慢释放出冰片原药, 2 h 内释放约 40% (图 3)。

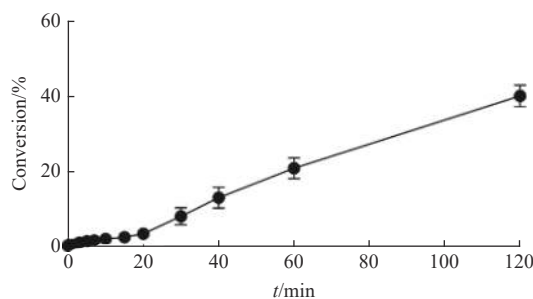


Figure 3 Percentages of borneol released from BP-3 into mouse plasma ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 BP-3 在 tMCAO 模型小鼠中的神经保护作用

在 tMCAO 模型小鼠中, BP-3 连续给药 4 d, 实验流程如图 4-A 所示。与假手术组相比, 模型组梗

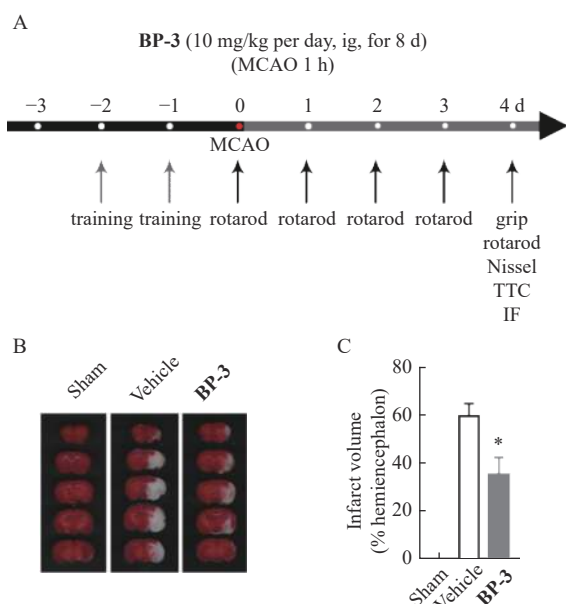


Figure 4 Continuous administration of ice phosphate in the mice model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6-10$)

A: Schematic diagram of BP-3 administration in the tMCAO/R mouse model; B: Representative map of brain TTC staining in mice; C: Statistical analysis of brain infarct areas in mice

* $P < 0.05$ vs vehicle group

死体积显著增大, 而 **BP-3** 干预后可以有效减少梗死面积 (图 4-B)。对梗死面积进行统计, 可以明显看到与模型组相比, 给药组梗死面积减少 20% 以上 (图 4-C)。

尼氏染色结果显示, 在 tMCAO 模型小鼠第 4 天, 与假手术组相比, 模型组尼氏体数目下降, 密度降低; 而与模型组相比, **BP-3** 干预后, 纹状体区域 (图 5-A) 和皮质区域 (图 5-B) 的尼氏体数目丢失情况均得到显著改善, 尼氏体分布均匀。

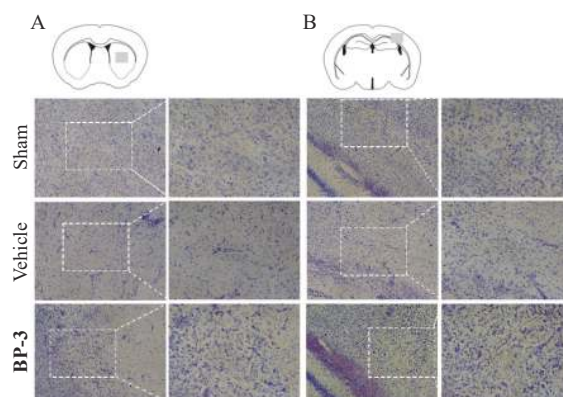


Figure 5 BP-3 reversed the loss of Nissl bodies in the mice model of tMCAO (Nissl staining)

A: 10 \times plain optical imaging image of the striatal region on the left, magnified on the right; B: 10 \times plain optical imaging image of the cortical region on the left, magnified on the right

3.4 BP-3 改善 tMCAO 模型小鼠的运动功能

如图 6 所示, 在小鼠抓力测试中, 假手术组并没有改变总时间。而在转棒实验中, 在脑卒中发生后, 小鼠停留时间明显下降, 随着恢复时间的延长, 小鼠在转棒的停留时间逐渐增大, 和假手术相比均有显著差异。而 **BP-3** 干预后发现, 小鼠停留时间减少但相较模型组时间稍长, 并且随着恢复时间的延长, 小鼠在转棒上停留时间逐渐增大, 和模型组相比, 在连续 **BP-3** 给药干预第 4 天有显著差异, 停留时间明显上升。

4 讨论

在传统中医理论中, 冰片具有开窍醒脑、清热止痛等功效, 可以清除热量并缓解疼痛, 用于发热性疾病伴意识不醒、惊吓逆转、脑卒中伴痰晕厥、气压伴暴发性逆转、恶性脑卒中、心绞痛等。同时

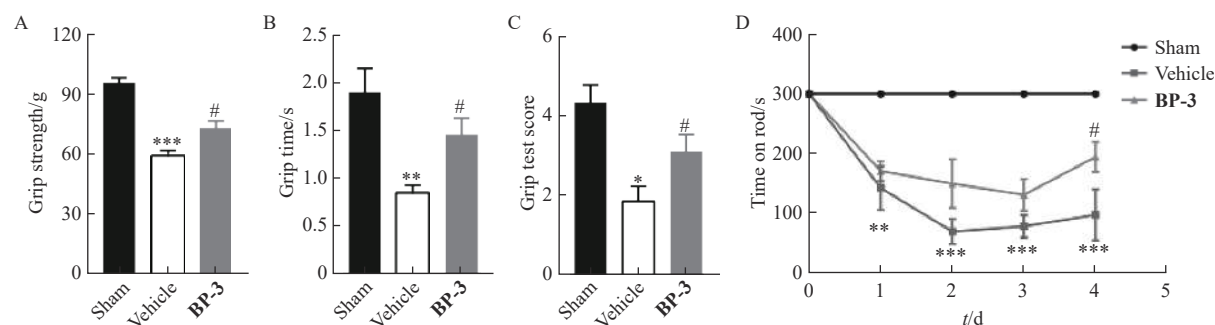


Figure 6 BP-3 improved the motor ability of the mice model of tMCAO ($\bar{x} \pm s$, $n = 6-10$)

A: Statistical analysis of grip strength; B: Statistical analysis of residence time of mice on the swivel bar; C: Statistical analysis of grip strength test of mice; D: Statistical analysis of residence time of mice on the swivel bar

$P < 0.05$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$ vs vehicle group

冰片被广泛认为是一种信使药物,能够在处方中将主要有效药物引入靶位点以提高治疗效果^[6], Zhang 等^[7]证明冰片具有促进血脑屏障开放并增加其他药物在脑内的浓度从而增大药效的作用。此外,冰片还可以促进其他药物的透皮吸收,增加其血液浓度和生物利用度^[8]。冰片在缺血性卒中亚急性期可以对抗血脑屏障损伤,干预降低炎症反应,从而避免神经元过度死亡^[9-10];在晚期还可以促进神经和血管生成^[8, 11-14]。冰片在临床和动物模型上表现出的治疗作用也证明了其具有广阔的药用开发前景。然而,水不溶性这一缺点大大限制了其在注射剂开发上的进一步发展。

磷酸酯类衍生物的应用是水溶性前体药物设计中最受欢迎的策略之一。在本研究中,为改善冰片的水不溶性,本研究以冰片为先导化合物,设计并合成了冰片磷酸酯前药 **BP-3**。溶解度检测数据显示,与冰片相比, **BP-3** 的水溶性得到显著提升,避免了在制剂时大量使用助溶剂,从而解决了助溶剂带来的不良反应以及注射过程中顺应性不佳等问题。后续生物活性评价实验表明, **BP-3** 在 tMCAO 模型小鼠中有效减少了梗死面积,也改善了缺血性脑卒中模型小鼠的运动功能,有效起到了神经保护作用。血浆稳定性实验结果显示, **BP-3** 在小鼠血浆中缓慢释放出冰片,释放量较高。本研究为水溶性冰片前药的开发提供了思路和实验依据。

References

- [1] Wu SM, Wu B, Liu M, *et al.* Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. *Lancet Neurol*, 2019, **18**(4): 394-405.
- [2] Xu J, Wang AX, Meng X, *et al.* Edaravone dextborneol versus edaravone alone for the treatment of acute ischemic stroke: a phase III, randomized, double-blind, comparative trial[J]. *Stroke*, 2021, **52**(3): 772-780.
- [3] Yu B, Yao Y, Zhang XF, *et al.* Synergic neuroprotection between *Ligusticum chuanxiong* hort and borneol against ischemic stroke by neurogenesis via modulating reactive astroglialosis and maintaining the blood-brain barrier[J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 666790.
- [4] Xu J, Wang YL, Wang AX, *et al.* Safety and efficacy of Edaravone Dextborneol versus edaravone for patients with acute ischaemic stroke: a phase II, multicentre, randomised, double-blind, multiple-dose, active-controlled clinical trial[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2019, **4**(3): 109-114.
- [5] Ji X, Wang J, Zhang L, *et al.* Application of phosphates and phosphonates prodrugs in drug research and development[J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, **48**(5): 621-634.
- [6] Li ZL, Zheng ZJ, Li XD, *et al.* Study on the effect of borneol on scutellarin permeabilization *in vitro* blood-retinal barrier[J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*(世界科学技术 中医药现代化), 2022, **24**(11): 4260-4268.
- [7] Zhang SS, Asghar S, Yang L, *et al.* Borneol and poly (ethylene glycol) dual modified BSA nanoparticles as an itraconazole vehicle for brain targeting[J]. *Int J Pharm*, 2020, **575**: 119002.
- [8] Li Y, Ren MH, Wang JJ, *et al.* Progress in borneol intervention for ischemic stroke: a systematic review[J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 606682.
- [9] Wang JY, Dong XY, Yu ZW, *et al.* Borneol inhibits CD4+T cells proliferation by down-regulating miR-26a and miR-142-3p to attenuate asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, **90**: 107223.
- [10] Liu SY, Long Y, Yu S, *et al.* Borneol in cardio-cerebrovascular diseases: pharmacological actions, mechanisms, and therapeutics[J]. *Pharmacol Res*, 2021, **169**: 105627.
- [11] Dong TW, Chen N, Ma X, *et al.* The protective roles of L-borneol, D-borneol and synthetic borneol in cerebral ischaemia via modulation of the neurovascular unit[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, **102**: 874-883.
- [12] Zhang WW, Wen JX, Jiang YX, *et al.* L-Borneol ameliorates cerebral ischaemia by downregulating the mitochondrial calcium uniporter-induced apoptosis cascade in pMCAO rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, **73**(2): 272-280.
- [13] Xie Q, Li JX, Dong TW, *et al.* Neuroprotective effects of synthetic borneol and natural borneol based on the neurovascular unit against cerebral ischaemic injury[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, **74**(2): 236-249.
- [14] Zhang YL, Liu SY, Wan JY, *et al.* Preparation, characterization and *in vivo* study of borneol-baicalin-liposomes for treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**: 5977-5989.